

## *Lonsdalea quercina* ssp. *populi*, agente causal del chancro de la corteza del chopo, una nueva bacteria identificada en España

Ana Palacio-Bielsa (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón / Instituto Agroalimentario de Aragón, IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Zaragoza. apalaciob@aragon.es).

Isabel M. Berruete (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Zaragoza. imberruete@aragon.es).

Raquel Collados, Miguel A. Cambra, María Luisa Palazón (Centro de Sanidad y Certificación Vegetal (CSCV). Zaragoza. rcollados@aragon.es; mcambra@aragon.es; mlpalazon@aragon.es).

Nieves Ibarra (Unidad de Salud de los Bosques (USB). Dirección General de Gestión Forestal, Caza y Pesca. Gobierno de Aragón. nibarra@ext.aragon.es).

Jaime Cubero (Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid. cubero@inia.es).

Adela M. Monterde, María Milagros López (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada, Valencia. monterde\_ade@gva.es; mlopez@ivia.es).

La bacteria *Lonsdalea quercina* (ex *Brenneria quercina*) ssp. *populi* ha sido recientemente descrita en Hungría y China como una nueva subespecie causante del chancro de la corteza del chopo. Los árboles afectados presentan chancros longitudinales en el tronco, de los que fluyen inicialmente exudados acuosos oscuros, seguidos de abundantes exudados espumosos de color blanco. Bajo la corteza se observa una masa cremosa de color blanquecino. Se produce un debilitamiento de los árboles y aquellos más severamente afectados pueden llegar a morir. En este trabajo se presenta la primera detección de *L. quercina* ssp. *populi* en España y se describen los métodos de diagnóstico utilizados.

PALABRAS CLAVE: bacteriosis, *Populus x euramericana*, sintomatología, diagnóstico, identificación

### INTRODUCCIÓN

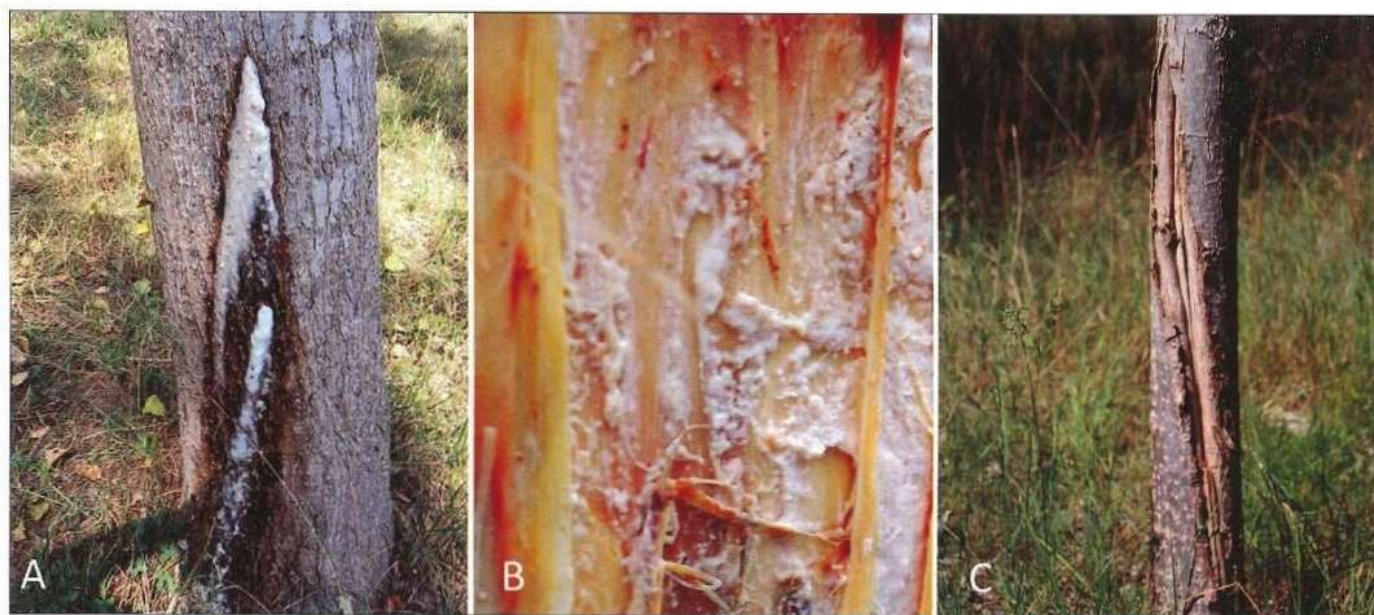
Según los últimos datos disponibles de la Comisión Nacional del Chopo, la superficie total de choperas en España en 2008 superó las 135.000 ha. Castilla y León, con 87.600 ha, es la comunidad autónoma con mayor superficie dedicada a la producción de chopo, mientras que Aragón, con algo más de 6.700 ha, ocupa la cuarta posición nacional. El principal uso del chopo es la producción de madera, siendo la principal especie de volumen de cortas que llega a superar el 50% del valor de la madera extraída, en su gran mayoría destinada a desenrollo (MAGRAMA, 2007). Otra posible aplicación es la obtención de biomasa pero, además, el chopo aporta beneficios ecológicos, como la recuperación de zonas de ribera degradadas por ser una especie autóctona y colonizadora que se arraiga con facilidad, o la fijación y almacenamiento de CO<sub>2</sub>. Actualmente, se trabaja en la mejora genética de esta especie, con el fin de estudiar clones con características óptimas para adaptarse a las necesidades de los populicultores (enfrentar los problemas sanitarios, mejorar el crecimiento y la calidad de la madera, etc.)

El género *Lonsdalea* fue propuesto por Brady y col. (2012) con la transferencia de *Brenneria quercina* (Hildebrand y Schroth 1967; Hauben y col., 1998) a un nuevo género bacteriano. Se consideraba que el género *Lonsdalea* contenía tres subespecies (*Lonsdalea quercina* ssp. *quercina*, *L. quercina* ssp. *iberica* y *L. quercina* ssp. *britannica*), cuyos aislados conocidos afectan al género *Quercus* (Brady y col., 2012). Sin embargo, recientemente se ha descrito una cuarta subespecie, *L. quercina* ssp. *populi*, agente causal de chancros en la corteza del chopo (Tóth y col., 2013), y que hasta el momento solo había sido identificada en Hungría (Tóth y col., 2013) y China (Li y col., 2014).

En España, en 2002, se detectaron en Melgar de Fernamental (Burgos) chopos híbridos *Populus x interamericana* (clon 'Beaupré') con síntomas que coincidían plenamente con los descritos recientemente en Hungría y China. Posteriormente, en Aragón, desde 2014, se han localizado nueve plantaciones de chopos híbridos *P. x euramericana* (clones 'I-214' y 'MC') en las localidades de Alcolea de Cinca, Monzón y Zaidín (ribera del Cinca, Huesca). Los chopos afectados, con edades comprendidas entre los 9 y 26 años, presentan chancros longitudinales en la corteza del tronco de los que fluyen inicialmente exudados acuosos oscuros, seguidos de abundantes exudados espumosos blancos (Figura 1A), observándose además una masa cremosa de color blanquecino bajo la corteza (Figura 1B). Estos exudados son claramente visibles durante los meses de verano



(junio-septiembre), pero desaparecen en otoño e invierno. Los chancros se localizan a distintas alturas, pudiendo llegar a alcanzar casi toda la longitud del tronco (Figura 1C). Los árboles afectados muestran un debilitamiento generalizado. Los análisis realizados han permitido identificar el agente causal de estos síntomas como *L. quercina* ssp. *populi*, lo que supone la primera cita de esta bacteria en España (Berruete y col., 2016).



**Figura 1.** Síntomas de *Lonsdalea quercina* ssp. *populi* en chopo (*Populus x euramericana*, clon 'I-214') observados en choperas de Castilla y León y Aragón. (A) Exudados acuosos oscuros y exudados espumosos de color blanco. (B) Masa cremosa bajo la corteza. (C) Chancros longitudinales en la corteza del tronco (Fotos: N. Ibarra).

## Materiales y métodos

Se estudió una colección de 10 aislados obtenidos de chopos afectados en Castilla y León y en Aragón (Cuadro 1). La caracterización de estos aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas, moleculares y ensayos de patogenicidad, y se compararon tanto con la cepa tipo de *L. quercina* ssp. *populi* DSM25466<sup>†</sup> (Tóth y col., 2013) como con cepas de otras subespecies de *Lonsdalea quercina* y de distintas especies del género *Brenneria* filogenéticamente próximas.

## Aislamientos

Muestras de los exudados blancos espumosos se resuspendieron en agua destilada estéril y se sembraron en el medio general B de King (King y col., 1954). Tras 4 días de incubación a 25°C, se seleccionaron colonias aisladas que se purificaron para su posterior identificación.

## Caracterización de los aislados

**Identificación bioquímica.** Para una primera identificación del género bacteriano se realizaron pruebas microbiológicas convencionales, deter-

Cepa*	Huésped	Origen y año aislamiento	Amplificación mediante PCR			Patogénesis en chopo
			(Diana, iniciadores)			
			Gen <i>flhA</i>	Gen <i>gyrB</i>	Gen <i>infB</i>	
			LqIF/LqIR	LogF/LogR	infBF/infBR	
<i>Lonsdalea quercina</i> ssp. <i>populi</i>	<i>Populus x interamericana</i> 'Beaupré'	Melgar de Fernamental				
CITA 397.1		(Burgos) (2002)	+	+	+	+
<i>L. quercina</i> ssp. <i>populi</i>	<i>P. x euramericana</i> 'MC'	Alcolea de Cinca (Huesca)				
CITA Bq-7, CITA Bq-8, CITA Bq-19		(2015)	+	+	+	+
<i>L. quercina</i> ssp. <i>populi</i>	<i>P. x euramericana</i> 'I-214'	Monzón (Huesca)				
CITA Bq-21, CITA Bq-22, CITA Bq-23, CITA 432/14-1		(2014, 2015)	+	+	+	+
<i>L. quercina</i> ssp. <i>populi</i>	<i>P. x euramericana</i> 'I-214'	Zaidín (Huesca) (2015)				
CITA Bq-24, CITA 459.5			+	+	+	+
<i>L. quercina</i> ssp. <i>populi</i> DSM25466 <sup>‡</sup>	<i>P. x euramericana</i>	Hungría				
<i>Lonsdalea quercina</i> CITA Bq-3	Encina ( <i>Quercus ilex</i> L.)	Zaragoza (2004)				
<i>Brenneria nigrifluens</i> IVIA-748-1	Nogal ( <i>Juglans regia</i> L.)	Tarragona (1986)				
<i>Brenneria salicis</i> CFBP 802 <sup>‡</sup>	Sauce ( <i>Salix alba</i> L.)	Reino Unido (1983)				

\*CITA: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (Zaragoza, Aragón); DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Alemania); IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia); CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (Angers, Francia). <sup>‡</sup>Cepa tipo de la especie.

<sup>a</sup>CITA: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (Zaragoza, Aragón); DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Alemania); IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia); CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (Angers, Francia). <sup>‡</sup>Cepa tipo de la especie.

**Cuadro 1.** Resumen de resultados obtenidos para las cepas españolas de chopo y comparación con cepas de otras subespecies de *Lonsdalea quercina* y especies del género *Brenneria*.



minando la reacción de Gram, la actividad enzimática de la citocromo-oxidasa, el metabolismo de la glucosa por vía oxidativa y/o fermentativa, la producción de levano y la hidrólisis de esculina y ureasa. Se realizaron pruebas adicionales utilizando el sistema miniaturizado API 20E (bioMérieux) según las indicaciones del fabricante, pero con temperatura de incubación de 25°C y realización de lecturas a las 48 h.

**Reacción de hipersensibilidad en tabaco.** Se prepararon suspensiones de cultivos bacterianos ( $10^8$  ufc/ml) de 48-72 h procedentes de medio B de King y se infiltraron en el mesófilo de hojas de tabaco (Klement y col., 1964).

**Identificación molecular.** Se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos de las subespecies de *Lonsdalea quercina*, diseñados en los operones flagelares de clase II (LqfF/LqfR) y en la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa (LqgF/LqgR), respectivamente (Shang y col., 2015). Además, se utilizó un tercer protocolo de PCR con iniciadores basados en la secuencia del factor de iniciación IF2 (infBF/infBR), que amplifican de manera específica *L. quercina* ssp. *populi* (patente CN103555850 A, 2014). En todos los protocolos se utilizó tanto PCR convencional como su adaptación a PCR en tiempo real con el fluoróforo SYBR Green I.

Además, con el fin de obtener una identificación más precisa, se siguió una estrategia de secuenciación parcial del ADNr 16S. Para ello se amplificó por PCR una región del ADNr 16S (Martínez-Murcia y col., 1992) para posteriormente ser purificada y secuenciada. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con las de aquellas de especies o subespecies de los géneros *Lonsdalea* y *Brenneria*, y otras filogenéticamente próximas, disponibles en la base de datos del GenBank. Se construyó un dendrograma usando el programa MEGA versión 6.06 (Tamura y col., 2013) siguiendo el método Maximum likelihood y el modelo de Tamura-Nei para determinar la similitud entre pares de secuencias.

**Verificación del poder patógeno.** Las inoculaciones se realizaron en chopos híbridos (*P. x eura-méricana* clon 'I-214') de 6 meses de edad, siguiendo la metodología descrita por Li y col. (2014). Para ello, se utilizaron fragmentos de tronco de 30 cm de longitud, que fueron desinfectados superficialmente con etanol 70% y sellados en sus extremos con Parafilm® M para evitar la desecación. Se realizaron



Figura 2. Aspecto de colonias de *Lonsdalea quercina* ssp. *populi* en medio B de King (Foto: M. A. Cambra).

lesiones de unos 5 mm de largo en forma de cruz en la corteza, en las que se depositaron 100  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas ( $10^7$  ufc/ml) en agua destilada estéril. Los fragmentos de tronco inoculados se colocaron en bandejas cubiertas con plástico, para mantener una elevada humedad relativa, y se incubaron a 28°C en oscuridad. Los testigos negativos se inocularon con agua destilada estéril. Se observaron los síntomas periódicamente hasta los 15 días tras la inoculación y se realizaron aislamientos de las lesiones para confirmar la presencia de *L. quercina* ssp. *populi*.

## Resultados

De todas las muestras analizadas se consiguió aislar de forma consistente cultivos bacterianos prácticamente puros. Las colonias, cuya morfología coincidía con las descritas para *L. quercina* ssp. *populi*, eran de color blanco-marfil, brillantes, circulares, ligeramente convexas y no fluorescentes bajo luz UV (Figura 2).

Al igual que la cepa tipo de *L. quercina* ssp. *populi* DSM25466<sup>T</sup>, los 10 aislados españoles estudiados eran Gram negativos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos, levano positivos y producían hidrólisis de esculina pero no ureasa. Asimismo, los resultados del sistema miniaturizado API 20E fueron coincidentes con los obtenidos para la cepa tipo DSM25466<sup>T</sup> (Cuadro 2).

Ni los aislados españoles de chopo ni la cepa tipo de *L. quercina* ssp. *populi* produjeron reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco a las 24-48 horas.

Mediante la amplificación por PCR convencional o en tiempo real con los iniciadores LqfF/LqfR y LqgF/LqgR, se obtuvieron fragmentos de ADN del tamaño esperado (382 pb y 286 pb, respectivamente) para las 10 cepas españolas estudiadas, así como para la cepa tipo *L. quercina* ssp. *populi* y las de otras subespecies de *L. quercina* de *Quercus ilex*, mientras que no hubo amplificación para las cepas de distintas especies de *Brenneria* (Cuadro 1). Cuando se utilizaron los iniciadores infBF/infBR, únicamente se obtuvo amplificación del fragmento esperado (341 pb) para las cepas de chopo españolas y la cepa tipo de *L. quercina* ssp. *populi* (Cuadro 1).

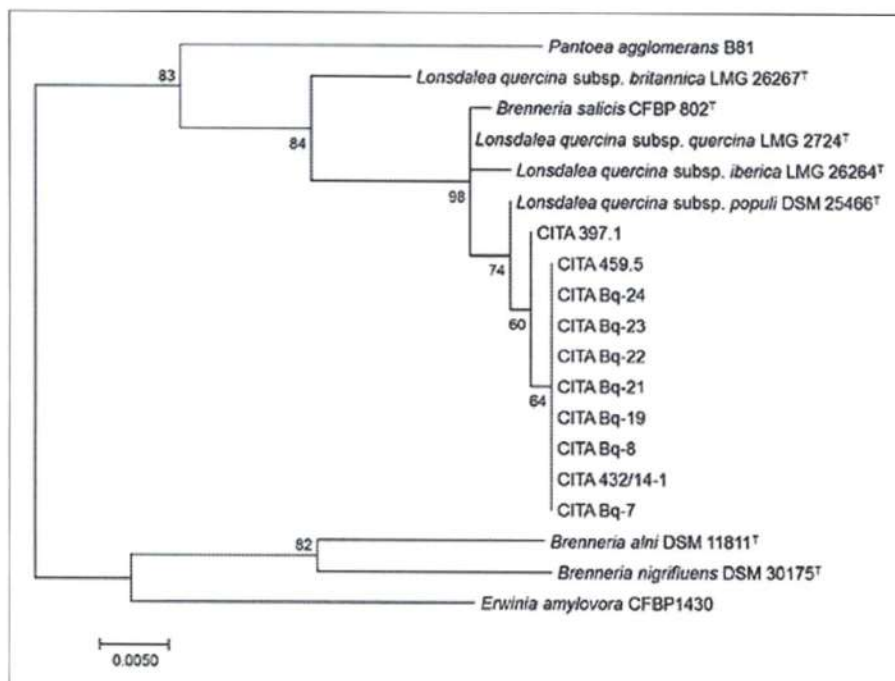
La secuenciación parcial del ADNr 16S reveló que las 10 cepas españolas tenían una identidad de secuencia del 99,8%-100% con la secuencia de la cepa tipo de *L. quercina* ssp. *populi*. Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los números de acceso KU531470 - KU531480. Los análisis filogenéticos indicaron que las secuencias de ADNr 16S de las 10 cepas de Castilla y León y de Aragón formaban un grupo con las secuencias de *L. quercina* ssp. *populi*, quedando claramente separadas de las secuencias de otras subespecies de *Lonsdalea quercina* y de especies del género *Brenneria* (Figura 3).



Todas las cepas fueron patógenas en chopo, induciendo los primeros síntomas a los 4 días tras la inoculación. Inicialmente se observaron exudados acuosos y espumosos blancos en los puntos de inoculación, reproduciendo así los síntomas observados en las infecciones naturales de campo (Figura 4A). A los 15 días, se observó también una necrosis del tejido de la corteza, que se extendía en torno al punto de inoculación (Figura 4B). Por el contrario, no se observaron síntomas en los chopos inoculados con otras subespecies de *Lonsdalea quercina*, *Brenneria* spp. ni en los testigos negativos (Figura 4C) (Cuadro 1). De todas las muestras con síntomas se aislaron bacterias identificadas como *L. quercina* ssp. *populi* mediante PCR.

## Conclusiones

Se han descrito diversas bacterias patógenas en chopo correspondientes a distintos géneros: *Agrobacterium tumefaciens* (Nesme y col., 1987), *Brenneria* sp. (Biosca y col., 2002, 2006), *B. populi* (Li y col., 2015), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Haworth y Spiers, 1988), *Xanthomonas arboricola* pv. *populi* (ex *Xanthomonas campestris* pv. *populi*) (de Kam, 1984), *Xanthomonas populi* (Ridé y Ridé, 1992) y *L. quercina* ssp. *populi* (Tóth y col., 2013; Li y col., 2014). Hasta el momento, solo *A. tumefaciens* y *Brenneria* sp. habían sido identificadas en España (MAGRAMA, 2010). Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, *L.*

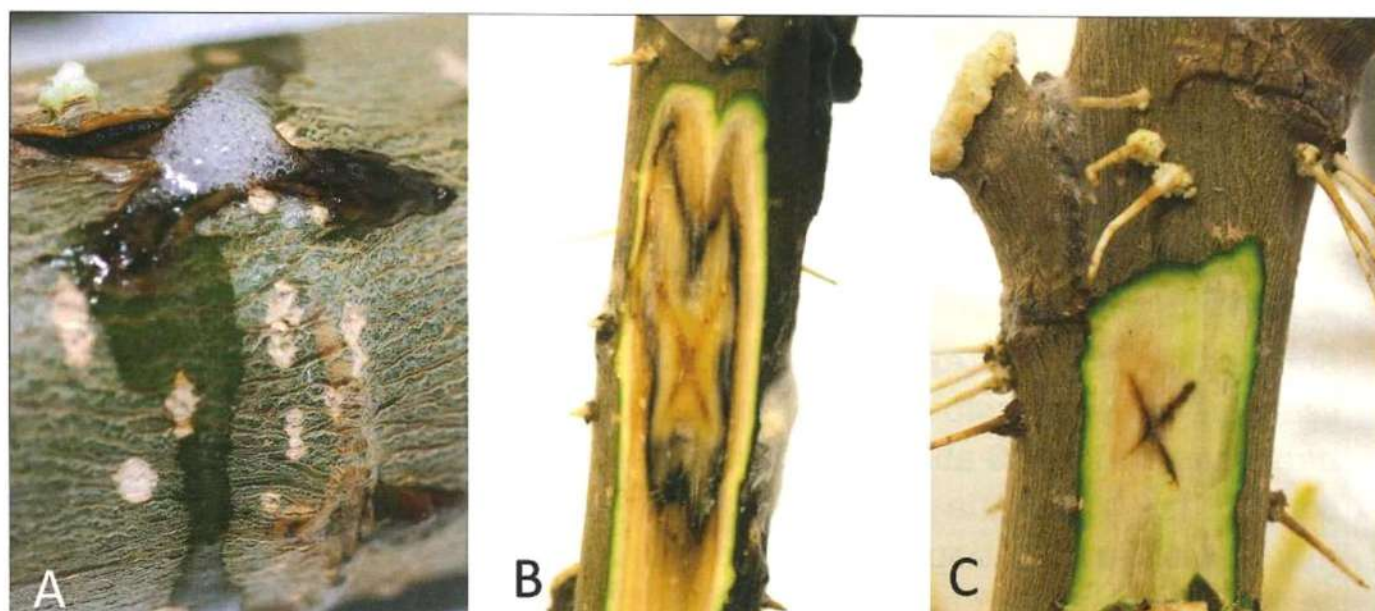


**Figura 3.** Dendrograma donde se muestra la posición de los aislados españoles de chopo en relación a otros aislados de los géneros *Lonsdalea* y *Brenneria*. El árbol se construyó analizando secuencias parciales del ADNr 16S usando el programa MEGA versión 6.06 (Tamura y col., 2013) siguiendo el método *Maximum likelihood* y el modelo de Tamura-Nei para determinar la similitud entre pares de secuencias. Los valores de Bootstrap están basados en 1.000 réplicas y se presentan por encima y debajo de las ramas.

*quercina* ssp. *populi* ha sido también identificada recientemente en España (Berruete y col., 2016).

Es muy escasa la información sobre la sensibilidad de los clones de chopo a esta nueva bac-

teriosis, y los únicos datos conocidos proceden de algunas plantaciones en China. Li y col. (2014) describieron que *P. x euramericana* cv 'Robusta' es relativamente resistente, *P. x euramericana* cv



**Figura 4.** Inoculación en fragmentos de tronco de chopo (*Populus x euramericana* clon 'I-214') de los aislados españoles de chopo. (A) Exudados acuosos y espuma blanca a los 4 días de la inoculación. (B) Necrosis de la corteza en torno al punto de inoculación tras 15 días. (C) Ausencia de síntomas para las cepas de *Lonsdalea quercina*, *Brenneria nigrifluens* y *Brenneria salicis*, aisladas de encina, nogal y sauce, respectivamente (Fotos: M. A. Cambra).

'74/76' y *P. deltooides* cv 'Zhonghe 1' muestran una sensibilidad intermedia (con una incidencia de hasta el 50% en algunas plantaciones) y *P. x euramericana* cv 'Zhonglin 46' es muy sensible (mostrando una incidencia de hasta el 70% de árboles afectados). De hecho, la incidencia de la enfermedad en el cv '74/76', cultivado a gran escala en China, se revela como una posible barrera para la expansión del cultivo del chopo (Li y col., 2014).

En las choperas afectadas en Aragón se ha producido un debilitamiento progresivo de los chopos infectados por *L. quercina* ssp. *populi* pero, hasta la fecha, no se ha constatado la muerte de árboles.

Dada la reciente detección de *L. quercina* ssp. *populi* en España (Berruete y col., 2016), resulta difícil predecir los daños potenciales que la enfermedad puede producir. Nuestras observaciones permiten constatar que los clones *P. x interamericana* clon 'Beaupré' y *P. x euramericana* 'I-214' y 'MC' son sensibles a la enfermedad, habiendo observado hasta el 30% de árboles afectados en algunas choperas. Ello supone un problema potencial para nuestra populicultura, puesto que los clones 'I-214' y 'MC' son los más comunes en España, siendo 'I-214' el utilizado en más del 70% de las plantaciones (CONFEMADERA, 2010). Se desconoce, sin

embargo, el grado de sensibilidad de otros clones cultivados en nuestro país, como 'Raspalje', 'Unal', 'Triplo', 'Canadá Blanco', 'Luisa Avanzo', etc.

Aunque hasta la fecha solo se tiene constancia de la enfermedad en algunas localidades de Castilla y León y Aragón, es necesario realizar nuevas prospecciones en otras CC. AA. para conocer su distribución real en nuestro país. A pesar de que se dispone de métodos de diagnóstico e identificación sensibles, rápidos y específicos para *L. quercina* subsp. *populi*, la biología y epidemiología de esta bacteria son aún prácticamente desconocidas y no se sabe, por ejemplo, cuáles son sus vías

Actividad (acrónimo)	Resultado*										
	CITA Bq-7	CITA Bq-8	CITA Bq-19	CITA Bq-21	CITA Bq-22	CITA Bq-23	CITA 432/14-1	CITA Bq-24	CITA 397.1	CITA 459.5	DSM 25466 <sup>†</sup>
β-galactosidasa (OPNG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa (ADH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa (LDC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de citrato (CIT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S (H <sub>2</sub> S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa (URE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptófano desaminasa (TDA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol (IND)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de acetoina (VP)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidificación de glucosa (GLU)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidificación de manitol (MAN)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidificación de inositol (INO)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación de sorbitol (SOR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación de ramnosa (RHA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación de sacarosa (SAC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidificación de melibiosa (MEL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acidificación de amigdalina (AMY)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidificación de arabinosa (ARA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*CITA: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (Zaragoza, Aragón); DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Alemania).

\*Reacción débil.

**Cuadro 2. Resultados del sistema miniaturizado API 20E (bioMérieux) de los 10 aislados españoles de chopo y comparación con la cepa tipo de *Lonsdalea quercina* ssp. *populi* DSM 25466<sup>†</sup>.**



de diseminación o donde sobrevive durante el invierno. Li y col. (2014) sugieren que los insectos, frecuentemente observados alimentándose en los exudados, podrían actuar como vectores, aunque no existen evidencias científicas de ello. Señalan, además, que es poco probable que se trate de una bacteria endófitas.

Todavía quedan muchas incógnitas por resolver acerca de esta enfermedad: ¿cuál es el posible origen de la infección?; ¿lleva varios años en las plantaciones o ha sido introducida recientemente?; ¿qué factores bióticos y abióticos promueven o inciden en el desarrollo de las infecciones?; ¿existen medios posibles de prevención y control? Los estudios sobre expresión diferencial de genes (DEGs)

podrían proporcionar algunas claves para desvelar el mecanismo molecular de respuesta de defensa a la infección por *L. quercina* ssp. *populi* y quizá, en un futuro, contribuir a la búsqueda de resistencia en programas de mejora genética (Hou y col., 2016).

**Abstract:** *Lonsdalea quercina* (ex *Brenneria quercina*) ssp. *populi* has been recently described in Hungary and China as a new bacterial subspecies causing bark canker disease of poplar. The bark of affected trees appears vertically cracked and a fluid sticky brownish, followed by a copious white frothy, ooze from the canker. Creamy white-coloured slime under the bark is observed. Affected poplars decay and severely affected trees can even die. This work

describes the first report of *L. quercina* ssp. *populi* in Spain and the diagnostic methods utilized.

**Keywords:** bacterial disease, *Populus x euramericana*, symptomatology, diagnostic, identification

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a Adán Quintín, José Luis Hernández e Ignacio Lázaro (Unidad de la Salud de los Bosques del Servicio de Planificación y Gestión Forestal. Gobierno de Aragón), así como a técnicos y APNs del Servicio Provincial de Desarrollo Rural y Sostenibilidad de la provincia de Huesca, por su valiosa colaboración en la identificación y seguimiento de chopas en Aragón.

## BIBLIOGRAFÍA

- Berruete, I. M., Cambra, M. A., Collados, R., Monterde, A., Cubero, J., López, M. M., Palacio-Bielsa, A., 2016. First report of bark canker disease of poplar caused by *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* in Spain. *Plant Disease* 100: 2159.
- Biosca, E. G., González, R., López-López, M. J., Martín S., López, M. M., 2002. Bacterias fitopatógenas del género *Brenneria* (*Erwinia*) identificadas en España. *PHYTOMA-España* 138: 73-77.
- Biosca, E. G., Martín, S., Zuriaga, P., Montón, C., Laura López-Ocaña, L., López, M. M., 2006. Characterization of *Brenneria* sp. from poplar cankers in Spain. En: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*. Wiley-VCH, pp. 385-389.
- Brady, C. L., Cleenwerck, I., Denman, S., Venter, S. N., Rodríguez-Palenzuela, P., Coutinho, T. A., De Vos, P., 2012. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand & Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a novel genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* ssp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* ssp. *iberica* ssp. nov. and *Lonsdalea quercina* ssp. *britannica* ssp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* ssp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1592-1602.
- CONFEMADERA (Comisión Española de Empresarios de la Madera). 2010. El cultivo y utilización del chopo en España.
- de Kam, M., 1984. *Xanthomonas campestris* pv. *populi*, the causal agent of bark necrosis in poplar. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90: 13-22.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., 1998. Phylogenetic position of the phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic Applied Microbiology* 21: 384-397.
- Haworth, R. H., Spiers, A. G., 1988. Characterisation of bacteria from poplars and willows exhibiting leaf spotting and stem canker in New Zealand. *European Journal of Forest Pathology* 18: 426-436.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. 1967. A new species of *Erwinia* causing the drippy nut disease of live oaks. *Phytopathology* 57: 250-253.
- Hou, J., Wu, Q., Zuo, T., Guo, L., Chang, J., Chen, J., Wang, Y., He, W., 2016. Genome-wide transcriptomic profiles reveal multiple regulatory responses of poplar to *Lonsdalea quercina* infection. *Trees-Structure and Function* 30: 1389-1402. doi:10.1007/s00468-016-1376-7
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Klement, Z., Farkas, G. L., Lovrekovich, L., 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- Li, Y., He, W., Ren, F., Guo, L., Chang, J., Cleenwerck, I., Ma, Y., Wang, H., 2014. A canker disease of *Populus x euramericana* in China caused by *Lonsdalea quercina* ssp. *populi*. *Plant Disease* 98:368-378.
- Li, Y., Fang, W., Xue, H., Liang, W.-x., Wang, L.-f., Tian, G.-z., Wang, X.-z., Lin, C.-l., Li X., Piao, C.-g., 2015. *Brenneria populi* sp. nov., isolated from symptomatic bark of *Populus x euramericana* canker. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 432-437.
- Martínez-Murcia, J. A., Benlloch, S., Collins, M. D. 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 412-421.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MAGRAMA), 2007. Anuario de Estadística Forestal. [http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/forestal\\_anuario\\_2007.aspx](http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/estadisticas/forestal_anuario_2007.aspx)
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MAGRAMA), 2010. Patógenos de plantas descritos en España (2ª ed.) ISBN: 978-84-0954-6. Online: [www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos\\_final\\_tcm7-1286.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos_final_tcm7-1286.pdf).
- Nesme, X., Michel, M. F., Digat, B., 1987. Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L. from a single nursery. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 655-659.
- Ridé, M., Ridé, S., 1992. *Xanthomonas populi* (ex Ridé 1958) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 652-653.
- Shang, J., Liu, B. L., He, W., 2015. A new method to detect *Lonsdalea quercina* in infected plant tissues by real-time PCR. *Forest Pathology* 45: 28-35.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729
- Tóth, T., Lakatos, T., Koltay, A., 2013. *Lonsdalea quercina* ssp. *populi* ssp. nov., isolated from bark canker of poplar trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2309-2313.